



Molecular Composition and Function of Apical Ciliary Tuft in Sea Urchin Embryos

著者	金 銀華
その他のタイトル	ウニ胚頂毛の分子組成と機能に関する研究
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2013
報告番号	12102乙第2671号
URL	http://hdl.handle.net/2241/00122744

氏名（本籍）	金 銀華	（ 中国 ）
学位の種類	博 士	（ 理学 ）
学位記番号	博 乙 第 2671 号	
学位授与年月日	平成 2 5 年 1 2 月 3 1 日	
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当	
審査研究科	生命環境科学研究科	
学位論文題目	Molecular Composition and Function of Apical Ciliary Tuft in Sea Urchin Embryos (ウニ胚頂毛の分子組成と機能に関する研究)	
主査	筑波大学教授	理学博士 稲葉 一男
副査	筑波大学教授	理学博士 沼田 治
副査	筑波大学教授	博士（理学） 和田 洋
副査	筑波大学准教授	博士（生命科学） 谷口 俊介

論 文 の 要 旨

微小管細胞骨格の一つである繊毛は、単細胞真核生物から哺乳類に至るまで生物界に広く見られる進化上高度に保存された細胞構造である。繊毛の骨格構造は軸糸と呼ばれており、一般的な運動繊毛では9回回転対称の周辺ダブルット微小管と中心対微小管からなる9+2構造を持つ。多細胞生物において、体制が複雑化するのに伴って繊毛も機能分化し、液体の移動だけでなく様々な刺激を受容する細胞のアンテナとしても用いられるようになった。棘皮、半索、刺胞、環形、軟体動物等の胚・幼生では体表が繊毛に覆われ、孵化後の遊泳運動に用いられるが、動物極には運動性が乏しく長い繊毛が生えている。この繊毛は頂毛(apical tuft)と呼ばれ、その形成位置や不動性から感覚繊毛と考えられてきた。

著者は、ウニ胚の遊泳繊毛と頂毛を構成するタンパク質の比較により、頂毛に特異的なタンパク質を同定し、さらに胚の繊毛運動や行動における機能解析を行った。棘皮動物であるウニの胚繊毛は、初期胞胚期には全ての細胞に存在する。一方、頂毛の存在は初期胞胚期には不明瞭であるが、孵化後2、3時間内に長い不動の繊毛として動物極において明確に観察されてくる。この頂毛の存在自体は古くから記載があるが、その形成過程・構造・機能に関しては全く報告されていない。そこで本研究は、ウニ胚の遊泳繊毛と頂毛を構成するタンパク質の比較により、頂毛に特異的なタンパク質を同定し、さらに胚の繊毛運動や行動における機能解析を進めた。

本論文では、まずバフンウニ (*Hemicentrotus pulcherrimus*) を研究材料に用い、頂毛が通常の遊泳繊毛と同様に9+2の微小管構造を持っていること、運動性繊毛に見られる外腕、内腕、ラジアルスポーク、中心装置等の付属構造が存在することを電子顕微鏡によって明らかとなった。さらに、正常胚およびZnSO₄で動物極化した胚から繊毛を単離し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動および二次元電気泳動によりタンパク質の比較を行ったところ、25 kDa付近にZn処理胚特異的なタンパク質を見いだした。このタンパク質は二次元電気泳動で3つのタンパク質スポットに分離した。これらのタンパク質を質量分析計により解析した結果、これらがいずれもグルタチオンS-トランスフェラーゼ (Glutathione S-

transferase theta: GSTT) であることが明らかになった。このGSTTの全長遺伝子をウニ胚から単離後、プローブを作製し、正常胚を用いてin situ ハイブリダイゼーションで解析を行ったところ、GSTTが頂毛形成領域に特異的に発現していることが明らかになった。一方、LC-MS/MSによりさらに詳しく遊泳繊毛と頂毛のタンパク質の違いを調べたところ、軸系タンパク質において両者の間に大きな違いがないこと、GSTTをはじめ複数のレドックス関連のタンパク質が頂毛に多く存在すること、セロトニンレセプターにホモロジーをもつタンパク質が遊泳繊毛に存在し頂毛には検出されないこと、感覚受容に関連するいくつかのタンパク質が頂毛に存在することがわかった。

以上の結果は、頂毛は十分に運動することができる能力を有しているにもかかわらず、何らかの調節により運動が抑制されていることを示唆している。さらに、レドックスにより軸系ダイニンの活性が調節されることが報告されていることから、GSTなどのレドックス関連タンパク質により頂毛の運動が抑制されている可能性が示唆された。また、頂毛が何らかのシグナルを受け、同時期に分化する神経系を介して遊泳繊毛の運動調節を行っていることも示唆された。

さらに、GSTTの詳細な機能を調べるため、すでに報告されているGST阻害剤bromosulphophthalein (BSP) を用いてGSTTの機能阻害実験を行った。BSP非処理胚では頂毛がほぼまっすぐに伸び運動性が乏しいのに対し、阻害剤処理胚では頂毛が傾斜、屈曲する様子が観察された。遊泳繊毛の運動や胚の遊泳速度は、正常胚とBSP処理胚の間で有意な違いが見られなかった。胚の行動の詳細な比較解析の結果、BSP処理胚は正常胚に比べ障害物に衝突した後の回避行動を効率よく行うことができないことが明らかになった。また、負の重力走性に関しては正常胚とBSP処理胚の間で有意な違いは見られなかったが、障害物の存在下で行動を観察したところ、BSP処理胚では衝突回避行動の阻害により上方に移動する効率が著しく低下することが明らかになった。

以上の研究成果は、頂毛がGSTTを介して頂毛の運動を制御することにより、幼生の行動に必要な機械刺激応答を司っていることを示唆している。これはプランクトン生活を送る海産無脊椎動物の幼生において、長年その機能が謎であった頂毛の本質的な意義を分子的に示したものである。

審 査 の 要 旨

本論文は、進化発生学的に古くから注目されてきた海産無脊椎動物幼生の頂毛に関して、機械受容と行動を司る構造であることを比較プロテオミクス、免疫学的手法、生理学的解析等、さまざまな研究手法を用いて示した点で極めて重要である。特に、レドックス制御に関わるGSTTが頂毛特異的なタンパク質として含まれ、繊毛運動の制御に関わること、プロテオミクスにより頂毛と遊泳繊毛の共通点と相違点を明らかにしたこと、幼生のプランクトン生活に関わる運動生理と頂毛の関連を明らかにしたことは、学術上極めて重要な研究成果であり、優れた学位論文であると判断する。

平成25年10月17日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。